昆虫病原线虫和噻虫嗪混用对韭蛆的杀虫效果及其体内保护酶和解毒酶活性的影响

武海斌[1], 宫庆涛[1], 陈珍珍[2], 姜莉莉[1], 公　义[3], 许永玉[2], 孙瑞红[1,*]

(1. 山东省果树研究所, 山东泰安 271000; 2. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018;
3. 山东省植物保护总站, 济南 250100)

摘要:【目的】害虫受到病原生物、化学农药作用后,会引起其体内生理生化的变化。本研究旨在阐明昆虫病原线虫和噻虫嗪联合作用下对韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 幼虫(韭蛆)的杀虫效果及体内保护酶和解毒酶活性的影响。【方法】采用培养皿滤纸法测定了芫菁夜蛾斯氏线虫 *Steinernema feltiae* SF-SN (Sf)(60 头/幼虫)与噻虫嗪(15 mg/L)混用对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫的 LT_{50};采用生化分析法比较分析不同时间下两者混用对其幼虫体内酶液蛋白质含量和体内酶[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)和乙酰胆碱酯酶(AChE)]活性的影响。【结果】Sf 与噻虫嗪混用处理韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫,其 LT_{50} 值为 41.05 h,比单独使用 Sf (LT_{50}:167.93 h)和噻虫嗪(LT_{50}:72.82 h)时分别缩短了 126.88 h 和 31.77 h;处理后 24 - 72 h,两者混用时对试虫的校正死亡率均显著高于两者单用,且在处理 72 h 时,校正死亡率达到 96.61%。与对照组相比,两者混用处理后 12, 24 和 36 h 时,韭蛆体内酶液蛋白质含量分别提高了 13.88%, 46.87% 和 57.99%,均显著高于对照组、Sf 处理组和噻虫嗪处理组。处理 24 h 时,两者混用组 SOD, CAT, AChE 和 GTSs 活性分别比对照降低了 47.48%, 28.73%, 71.04% 和 29.97%;处理 36 h时,酶活性分别比对照降低了 46.34%, 42.22%, 58.37% 和 11.87%,均显著低于对照组、Sf 处理组和噻虫嗪组,比单剂具有更强的抑制作用。【结论】Sf 和噻虫嗪联合作用韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫后,其 LT_{50} 值比两者单用时显著缩短,且对幼虫体内 SOD, CAT, AChE 和 GSTs 活性均具有更强的抑制作用。

关键词: 韭菜迟眼蕈蚊; 昆虫病原线虫; 芫菁夜蛾斯氏线虫 SF-SN; 噻虫嗪; 酶活性

中图分类号: Q965.9　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2018)07-0851-09

Bioefficacy of the combined application of entomopathogenic nematodes and thiamethoxam and its effects on the protective and detoxification enzyme activities in *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae) larvae

WU Hai-Bin[1], GONG Qing-Tao[1], CHEN Zhen-Zhen[2], JIANG Li-Li[1], GONG Yi[3], XU Yong-Yu[2], SUN Rui-Hong[1,*] (1. Shandong Institute of Pomology, Tai'an, Shandong 271000, China; 2. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 3. Shandong Plant Protection Station, Jinan 250100, China)

Abstract:【Aim】Pathogenic organisms or chemical pesticides can induce the defense responses of insects, and the physiological adaptation of insects might differ under the combined application of pathogenic organisms and chemical pesticides. This study aims to investigate the effects of combined

基金项目: 山东省农业科学院青年科研基金(2015YQN30); 山东省自然科学基金项目(ZR2018PC019)
作者简介: 武海斌, 男, 1983 年生, 山东肥城人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为害虫生物防治和化学生态学, E-mail: jinghaijiangxuan@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: srhruihong@126.com
收稿日期 Received: 2017-10-13; 接受日期 Accepted: 2018-04-25

application of entomopathogenic nematodes and thiamethoxam on *Bradysia odoriphaga*.【Methods】The LT_{50} value of the combined application of *Steinernema feltiae* SF-SN strain (Sf) (60 IJs/larva) and thiamethoxam (15 mg/L) against the 3rd instar larvae of *B. odoriphaga* was determined with filter paper culture method in the laboratory, and its effects on the protein content of enzyme solution and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferases (GSTs) and acetylcholinesterase (AChE) in *B. odoriphaga* larvae at different time after treatment were assayed by biochemical analysis.【Results】The LT_{50} value (41.05 h) of the combined application of Sf and thiamethoxam against the 3rd instar larvae of *B. odoriphaga* decreased by about 126.88 h and 31.77 h, respectively, as compared with those in treatments with the respective single agents with (Sf LT_{50}: 167.93 h) and thiamethoxam (LT_{50}: 72.82 h). During 24 – 72 h after treatment, the corrected mortality rates of *B. odoriphaga* larvae in the combined treatment group were significantly higher than those in treatments with the respective single agent, and reached the peak (96.61%) at 72 h. The protein contents of enzyme solution in *B. odoriphaga* larvae in the combined treatment group at 12, 24 and 36 h after treatment increased by 13.88%, 46.87% and 57.99%, respectively, as compared with the control group, and were significantly higher than those in the control group, Sf treatment group and thiamethoxam treatment group. The activities of SOD, CAT, AChE and GTSs in larvae in the combined treatment group decreased by 47.48%, 28.73%, 71.04% and 29.97% at 24 h after treatment, and by 46.34%, 42.22%, 58.37% and 11.87% at 36 h, respectively, as compared with the control. The activities of the four enzymes in the combined treatment group were significantly lower than those in the control group, Sf treatment group and thiamethoxam treatment group at 24 h and 36 h after treatment.【Conclusion】The LT_{50} value of the combined application of Sf and thiamethoxam against the 3rd instar larvae of *B. odoriphaga* is significantly lower than those in treatments with the respective single agent, and the combined treatment can significantly restrain the activities of SOD, CAT, AChE and GTSs in larvae.

Key words: *Bradysia odoriphaga*; entomopathogenic nematode; *Steinernema feltiae* SF-SN; thiamethoxam; enzyme activity

韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga*，其幼虫俗称韭蛆，属双翅目(Diptera)长角亚目(Nematocera)眼蕈蚊科(Sciaridae)迟眼蕈蚊属 *Bradysia*，是主要的根蛆类害虫(杨集昆和张学敏, 1985)。该虫取食范围广，可为害百合科、菊科、藜科、十字花科、葫芦科、伞形科等 7 科 30 多种蔬菜，其中以韭菜 *Allium tuberosum* 受害最重(Li *et al*., 2015)。该虫以幼虫在韭菜鳞茎内或韭根周围 3 ~ 4 cm 表土层休眠越冬，春、秋两季发生最重。在保护地韭菜栽培中，温湿度条件适合韭蛆的生长发育，故能够持续猖獗危害(武海斌等, 2015b)。目前，防治韭蛆仍以化学杀虫剂为主，常使用有机磷类、氨基甲酸酯类和新烟碱杀虫剂(Ma *et al*., 2013)。噻虫嗪属于第二代烟碱类高效低毒杀虫剂，具有胃毒、触杀及内吸作用，对迟眼蕈蚊属 2、3 龄幼虫具有较高的活性(Cloyd and Dickinson, 2006)，对韭蛆也有较好的防治效果(Zhang *et al*., 2016; 武海斌等, 2016)。

昆虫病原线虫(entomopathogenic nematodes, EPN)对寄主有主动搜寻能力，可有效防治多种土栖性害虫(Shapiro and McCoy, 2000)。但是，与化学杀虫剂相比，昆虫病原线虫杀虫效果缓慢且不稳定(Georgis and Gaugler, 1991)。为此，研究人员开始将昆虫病原线虫与化学杀虫剂混用来防治害虫，并已取得较好效果。王玉东等(2012)将低浓度吡虫啉与长尾斯氏线虫 *Steinernema longicaudum* X-7 混用处理暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* 2 龄幼虫，杀虫效果明显提高，表现为增效作用。武海斌等(2014)在室内利用吡虫啉、毒死蜱和高效氯氰菊酯 3 种杀虫剂分别与 3 个品系线虫即嗜菌异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* H06、小卷叶蛾斯氏线虫 *S. carpocapsae* All 和芫菁夜蛾斯氏线虫 *S. feltiae* SF-SN 混用处理韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫，其死亡率明显高于线虫和杀虫剂单用处理，在此基础上获得了对该虫具有增效作用的最佳组合——*S. feltiae* SF-SN 与噻虫嗪，并通过大田试验证实，该组合浓度对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫的防治效果显著提高，且

能够持续防效 6 周以上（武海斌等，2016；Wu *et al*.，2017）。然而，昆虫病原线虫与噻虫嗪混用对害虫的增效作用机理至今尚未见报道（Koppenhöfer *et al*.，2000；王玉东等，2012；Wu *et al*.，2017）。推测其机理为：一方面可能是药剂刺激线虫的感受神经，致使昆虫病原线虫兴奋，运动增加，导致线虫攻击能力增强；另一方面可能是降低害虫防御能力，利于线虫侵入；此外还可能是两者混用刺激目标昆虫代谢活动的变化（Fallon *et al*.，2004）。

当害虫受到病原生物或化学农药作用后，会诱导害虫的代谢活动发生改变，诱发一系列的防御反应（曹溪等，2015）。保护酶和解毒酶作为昆虫体内两类重要的酶系，在维持昆虫正常的生理生化代谢、分解有毒物质方面具有重要作用，常被用来作为生物体生理状态改变的度量指标（Zhu-Salzman and Zeng，2015）。关于病原生物或化学药剂对害虫体内酶活性的研究已有报道，如昆虫病原线虫对桃小食心虫 *Carposina sasakii*（任晓亚，2014）、光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*（阎爱华等，2012；任晓亚等，2013）及华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita*、暗黑鳃金龟 *H. parallela* 和铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta*（孙昊雨等，2014）；细菌（高欢欢等，2016）或苯并噻唑（Zhao *et al*.，2016）对韭蛆、溴氰虫酰胺对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（余慧灵等，2015）等害虫体内酶活性的影响。因此，基于昆虫病原线虫与噻虫嗪混用的增效机理推测，从两者混用后能否引起目标昆虫生化指标的变化展开研究，探讨昆虫病原线虫和噻虫嗪联合作用下对韭蛆毒力变化和对虫体内生化指标的影响。为此，我们系统研究了昆虫病原线虫和噻虫嗪混用对韭蛆的毒力（LT_{50}），并测定了对该虫体内酶液蛋白质含量的变化以及体内保护酶［超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）和过氧化氢酶（catalase，CAT）］和解毒酶［谷胱甘肽-S-转移酶（glutathione S-transferase，GSTs）和乙酰胆碱酯酶（acetylcholinesterase，AChE）］的活性，以揭示两者混用对韭蛆代谢活动影响，为进一步探讨两者共同作用下对韭蛆的增效作用机理提供理论支持，同时也为进一步研发安全性的昆虫病原线虫增效剂提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料及仪器

1.1.1　供试虫源：韭菜迟眼蕈蚊从山东泰安韭菜田采集，在室内饲养 3 代后取 3 龄幼虫备用，饲养条件为温度 22 ±1℃、相对湿度 75%、自然光照。

1.1.2　供试昆虫病原线虫：芫菁夜蛾斯氏线虫 *S. feltiae* SF-SN（简称 Sf），用大蜡螟 *Galleria mellonella* 老熟幼虫活体繁殖获得侵染期幼虫。

1.1.3　试剂及杀虫剂：考马斯亮蓝 G-250，牛血清蛋白（BSA），磷酸缓冲液（PB）缓冲液，以及 SOD，CAT，GSTs 和 AChE 酶活性试剂盒，均购自南京建成生物工程公司。杀虫剂 95% 噻虫嗪（thiamethoxam，Th）原药，青岛中达农业科技有限公司产品。

1.1.4　仪器：RXZ-328A 型培养箱，宁波江南仪器厂；SCR20BC 型日立高速冷冻离心机，日立工机株式会社；UV-2450 可见分光光度计，日本岛津公司。

1.2　芫菁夜蛾斯氏线虫和噻虫嗪混用对韭蛆的处理

分别根据 Sf 和噻虫嗪对 3 龄韭菜迟眼蕈蚊幼虫的 LD_{50}（武海斌等，2015b）和 LC_{50}（张鹏等，2014），结合 Sf 与噻虫嗪对该虫最佳组合浓度范围（Wu *et al*.，2017），设计噻虫嗪单独处理（浓度为 15 mg/L），Sf 单独处理（浓度为 60 条/幼虫），Sf（60 条/幼虫）与噻虫嗪（15 mg/L）混用处理，以及清水对照。采用培养皿滤纸法（Wu *et al*.，2017），即在直径 15 cm 的玻璃培养皿中放两张中速滤纸，放入 30 头 3 龄幼虫和适量韭菜茎段，分别滴加各处理液 1.5 mL。每处理重复 4 次，处理后的幼虫置于温度 22 ±1℃、相对湿度 60% ±10% 的培养箱内，光周期为 24 h 全暗。存活的幼虫用于蛋白质含量和酶活性的测定。

1.3　芫菁夜蛾斯氏线虫与噻虫嗪混用对韭蛆的致死效果

分别于处理 12，24，36，48，60 和 72 h 后用小毛笔尖轻触虫体，不动者记为死亡，计算死亡率和校正死亡率。求得毒力回归方程，计算致死中时（LT_{50}）及相关系数。死亡率 =［处理前活虫数 − 处理后活虫数）/处理前活虫数］×100%，校正死亡率 =［处理死亡率 − 对照死亡率）/（100 − 对照死亡率）］×100%。

1.4　酶液制备

参照高欢欢等（2016）的酶液提取方法，分别于处理 0，12，24，36，48 和 60 h 后，收集每个处理存活的虫体置于 1.5 mL 离心管中并准确称重，加入 1 mL PB（0.05 mol/L，pH 7.0）和少量石英砂，冰浴充分研磨，混匀，于 4℃ 冰箱内放置15 min后在超速冷冻离心机 12 000 r/min 4℃ 离心 10 min。取上清

液分装入0.5 mL的Eppendorf离心管中,用于SOD, CAT和GSTs活性测定,为防止反复冻溶而导致酶液失活,-20℃保存备用。

参照任学祥等(2011)的AChE酶液提取方法,分别于处理0, 12, 24, 36, 48和60 h后,收集每个处理存活的虫体在1.5 mL离心管中并准确称重,加入1 mL PB (0.1 mol/L, pH 7.4)和少量石英砂,冰浴充分研磨,混匀,于4℃冰箱内放置15 min后在超速冷冻离心机12 000 r/min 4℃离心15 min,取上清液作为酶液。

1.5 蛋白质含量的测定

参照Bradford(1976)的考马斯亮蓝G-250染色法测定。分别配制考马斯亮蓝G-250溶液和牛血清蛋白标准溶液,制作标准曲线。每个样品取0.1 mL酶液于试管中,对照管中加入0.1 mL PB,再加入5 mL考马斯亮蓝G-250试剂,充分混合,放置2 min后,在595 nm波长下比色测定,记录OD值,重复3次,根据标准曲线计算样品在该测定液中蛋白浓度。

1.6 酶活性测定

SOD, CAT, GSTs和AChE酶活性的测定均严格按照南京建成生物工程公司试剂盒中的说明进行检测。酶活性值根据试剂盒说明书中的公式进行计算。SOD, CAT, GSTs和AChE酶活性测定波长分别为550, 240, 412和412 nm。SOD活性单位定义为每毫克组织蛋白在1 mL反应液中抑制率为50%时所需的酶量为一个酶活力单位;CAT活性单位定义为1 mg组织蛋白每秒分解1 μmol H_2O_2 酶量为一个活力单位;GST活性单位定义为每毫克蛋白在37℃反应1 min使反应体系中的GSH降低1 μmol/L为一个活力单位;AChE活性单位定义为每毫克蛋白每分钟催化产生1 μmol 5-巯基-硝基苯甲酸的酶量为一个活力单位。

1.7 数据分析

试验数据采用Microsoft Excel表格处理软件和SPSS Base Ver. 19.0统计软件进行数据分析。对韭蛆的校正死亡率、蛋白质含量以及SOD, CAT, GSTs和AChE活性分别采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 芫菁夜蛾斯氏线虫与噻虫嗪混用对韭蛆的杀虫效果

单独使用 LD_{50} 的Sf进行处理,对韭菜迟眼蕈蚊3龄幼虫的致死作用有一个潜伏期,一般到48 h时试虫的校正死亡率才开始上升,其 LT_{50} 值为167.93 h(表1),且处理72 h时,该试虫的校正死亡率为13.28%(图1)。单独使用 LC_{50} 的噻虫嗪(15 mg/L)对该试虫的 LT_{50} 值为72.82 h(表1),处理72 h时,其校正死亡率为49.44%(图1)。采用Sf与噻虫嗪混用,与单独使用Sf及噻虫嗪相比,其致死作用的潜伏期明显缩短,其 LT_{50} 值为41.05 h,比单独使用Sf时缩短了126.88 h,比单独使用噻虫嗪时缩短了31.77 h。处理24 h后,两者混用对该虫的校正死亡率显著提高,且在处理72 h时,其校正死亡率达到96.61%,显著高于两者单用($F=562.71$, $df=2$, $P<0.001$)。

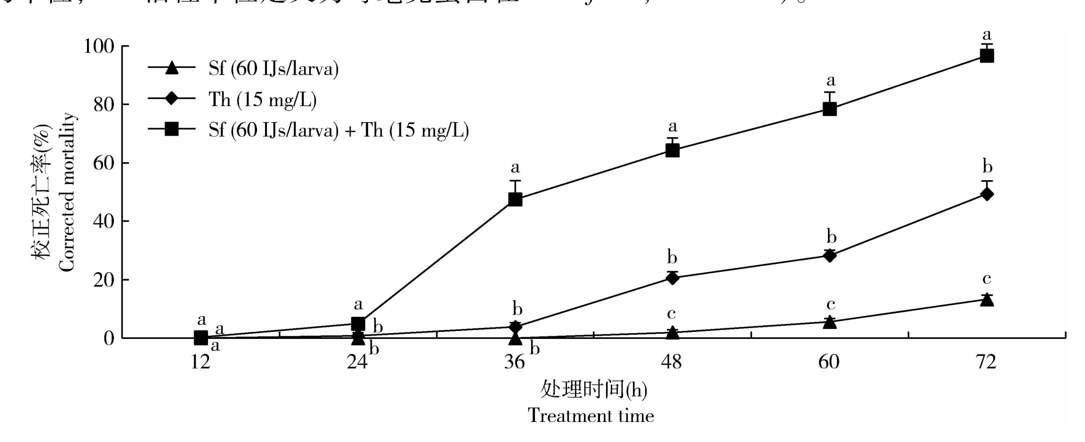


图1 芫菁夜蛾斯氏线虫SF-SN(Sf)与噻虫嗪(Th)混用时韭菜迟眼蕈蚊3龄幼虫的校正死亡率

Fig. 1 Corrected mortality of the 3rd instar larvae of *Bradysia odoriphaga* in combined application of *Steinernema feltiae* SF-SN (Sf) and thiamethoxam (Th)

图中点上短线为标准误;12, 24, 36, 48和72 h死亡率分别用同一时间点的空白对照死亡率(0, 0, 0, 0.28%, 0.56%和1.67%)进行校正;短线上标有小写字母表示同一时间内不同处理间校正死亡率差异显著($P<0.05$, Tukey氏检验)。Bar above the dot means the standard error (*SE*). The mortality was corrected for the control mortality (0, 0, 0, 0.28%, 0.56% and 1.67% at 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h, respectively). Different lowercase letters above indicate that the corrected mortality rates in different treatments at the same treatment time are significantly different at the 0.05 level by Tukey's test.

表 1　芫菁夜蛾斯氏线虫 SF-SN(Sf)与噻虫嗪混用对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫的 LT_{50} 值

Table 1　LT_{50} values of combined application of *Steinernema feltiae* SF-SN (Sf) and thiamethoxam against the 3rd instar larvae of *Bradysia odoriphaga*

处理 Treatment	毒力回归方程 Regression equation of toxicity	LT_{50} (h)	χ^2 (*df*)
芫菁夜蛾斯氏线虫 SF-SN (60 条/幼虫) Sf (60 IJs/larva)	$y = -8.121 + 1.585x$	167.93	31.751(4)
噻虫嗪 Thiamethoxam (15 mg/L)	$y = -10.836 + 2.527x$	72.82	18.631(4)
芫菁夜蛾斯氏线虫 SF-SN (60 条/幼虫) + 噻虫嗪(15 mg/L) Sf (60 IJs/larva) + thiamethoxam (15 mg/L)	$y = -10.049 + 2.705x$	41.05	45.684(4)

2.2　芫菁夜蛾斯氏线虫与噻虫嗪混用对韭蛆的酶液蛋白含量的影响

芫菁夜蛾斯氏线虫 SF-SN(Sf)与噻虫嗪混合处理韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫后，随着处理时间延长其酶液蛋白含量表现为先升高后降低的趋势。由图 2 显示，和对照组相比，处理 12 h 时，Sf 处理组和 Sf 与噻虫嗪混合处理组体内酶液蛋白含量分别提高了 8.28% 和 13.88%，噻虫嗪处理组的则降低了 4.11%；处理 24 h 时，Sf 处理组和 Sf 与噻虫嗪混合处理组的分别提高了 30.45% 和 46.87%，噻虫嗪处理组的则降低了 6.93%；处理 36 h 时，Sf 处理组、噻虫嗪处理组和 Sf 与噻虫嗪混合处理组分别提高了 26.04%，2.99% 和 57.99%，且 Sf 与噻虫嗪混合处理组中的含量达到最高值(0.89 mg/mL)，显著高于其他处理($F = 167.694$, $df = 3$, $P < 0.001$)；处理 48 ~ 60 h，Sf 与噻虫嗪混合处理组的体内酶液蛋白含量不断下降，至处理 60 h 降为最低值，显著低于对照组、Sf 处理组和噻虫嗪处理组($F = 64.647$, $df = 3$, $P < 0.001$)。

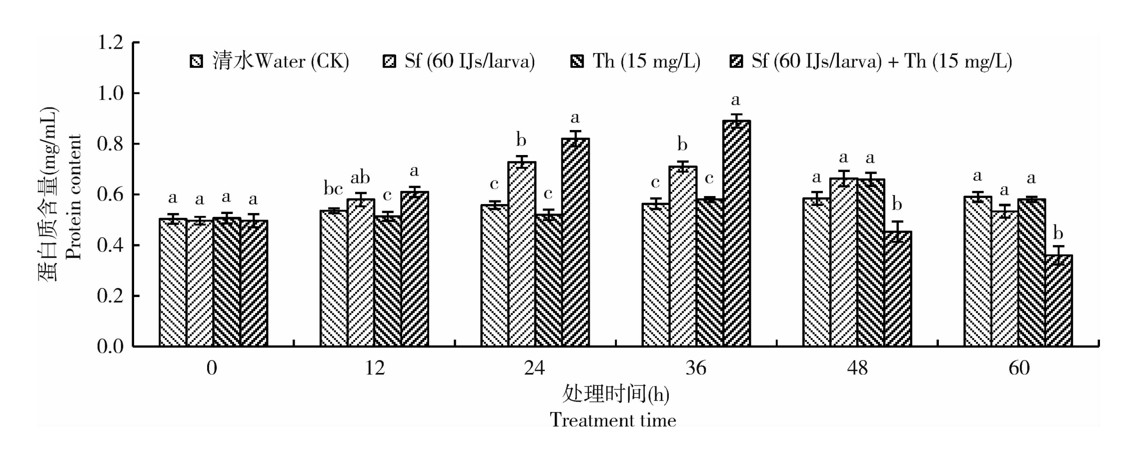


图 2　芫菁夜蛾斯氏线虫 SF-SN(Sf)和噻虫嗪(Th)混用对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫酶液蛋白含量的影响

Fig. 2　Effect of combined application of *Steinernema feltiae* SF-SN (Sf) and thiamethoxam (Th) on the protein content of enzyme solution in the 3rd instar larvae of *Bradysia odoriphaga*

图中柱上短线为标准误。柱上标有不同小写字母表示同一时间不同处理间差异显著(Tukey 氏检验；$P < 0.05$)。图 3 同。Bar above the histograms mean the standard error (*SE*). Histograms with different lowercase letters indicate significant difference among different treatments at the same time at the 0.05 level by Tukey's test. The same for Fig. 3.

2.3　芫菁夜蛾斯氏线虫与噻虫嗪混用对韭蛆体内 SOD 活性的影响

芫菁夜蛾斯氏线虫 SF-SN(Sf)与噻虫嗪混用对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫体内 SOD 活性的影响如图 3(A)所示，随着处理时间的延长，幼虫体内 SOD 活性呈现激活-抑制-激活规律。和对照组相比，处理 12 h 时，Sf 处理组、噻虫嗪处理组和 Sf 与噻虫嗪混合处理组中 SOD 活性分别提高了 9.28%，3.17% 和 12.28%，且 Sf 与噻虫嗪混合处理组表现为更高的激活作用；处理 24 h，Sf 处理组和噻虫嗪处理组中的 SOD 活性分别提高了 5.43% 和 10.28%，均表现为激活作用，而 Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 SOD 活性降低了 47.48%，显著低于 Sf 处理组、噻虫嗪处理组和对照组($F = 416.43$, $df = 3$, $P < 0.001$)，表

现为更强烈的抑制作用；处理 36 h，Sf 处理组、噻虫嗪处理组和 Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 SOD 活性分别降低了 16.96%，22.82% 和 46.34%，且 Sf 与噻虫嗪混合处理组显著低于 Sf 处理组、噻虫嗪处理组和对照组（$F = 416.43$，$df = 3$，$P < 0.001$），表现出更强烈的抑制作用；处理 48 和 60 h，Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 SOD 活性均显著高于 Sf 处理组、噻虫嗪处理组和对照组。

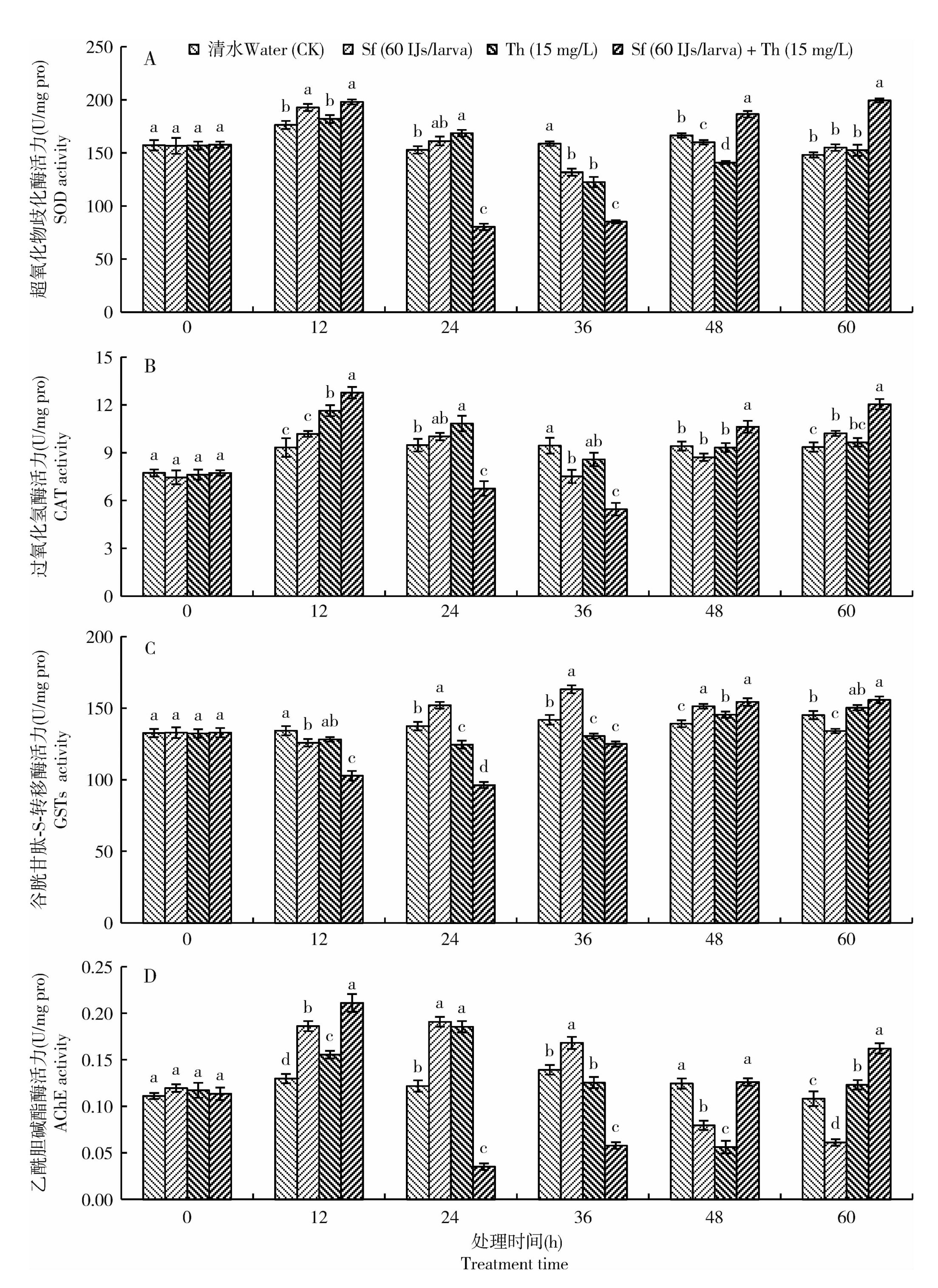


图 3 芫菁夜蛾斯氏线虫 SF-SN（Sf）和噻虫嗪（Th）混用对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫体内 4 种酶活性的影响

Fig. 3 Effect of combined application of *Steinernema feltiae* SF-SN (Sf) and thiamethoxam (Th) on the activities of four enzymes in the 3rd instar larvae of *Bradysia odoriphaga*

A：超氧化物歧化酶 SOD；B：过氧化氢酶 CAT；C：谷胱甘肽-S-转移酶 GSTs；D：乙酰胆碱酯酶 AChE.

2.4　芫菁夜蛾斯氏线虫与噻虫嗪混用对韭蛆体内 CAT 活性的影响

芫菁夜蛾斯氏线虫 SF-SN(Sf)与噻虫嗪混用对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫体内 CAT 活性的影响如图 3(B)所示，随着处理时间的延长，幼虫体内 CAT 活性呈现激活-抑制-激活规律。和对照组相比，处理 12 h 时，Sf 处理组、噻虫嗪处理组和 Sf 与噻虫嗪混合处理组中 CAT 活性分别提高了 9.11%，24.71% 和 36.86%，且 Sf 与噻虫嗪混合处理组中 CAT 活性显著高于其他处理组，表现为更高的激活作用($F = 45.038$, $df = 3$, $P < 0.001$)；处理 24 h，Sf 处理组和噻虫嗪处理组中的 CAT 活性分别提高了 5.70% 和 14.35%，均表现为激活作用，而 Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 CAT 活性降低了 28.73%，表现为更强烈的抑制作用；处理 36 h，Sf 处理组、噻虫嗪处理组和 Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 CAT 活性分别降低了 20.46%，9.17% 和 42.22%，且 Sf 与噻虫嗪混合处理组显著低于其他处理组($F = 47.202$, $df = 3$, $P < 0.001$)，表现为更强烈的抑制作用；处理 48 和 60 h，Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 CAT 活性均显著高于 Sf 处理组、噻虫嗪处理组和对照组。

2.5　芫菁夜蛾斯氏线虫与噻虫嗪混用对韭蛆体内 GSTs 活性的影响

芫菁夜蛾斯氏线虫 SF-SN(Sf)与噻虫嗪混用对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫体内 GSTs 活性的影响如图 3(C)所示，随着处理时间的延长，幼虫体内 CAT 活性呈现抑制-激活规律。和对照组相比，处理 12 h 时，Sf 处理组、噻虫嗪处理组和 Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 GSTs 活性分别降低了 6.23%，4.48% 和 23.43%，且 Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 GSTs 活性显著低于其他处理组，表现为更强的抑制作用($F = 73.937$, $df = 3$, $P < 0.001$)；处理 24 h，Sf 处理组中的 GSTs 活性提高了 10.55%，表现为激活作用，而噻虫嗪处理组和 Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 GSTs 活性分别降低了 9.41% 和 29.97%，且 Sf 与噻虫嗪混用表现为更强烈的抑制作用；处理 36 h 时，Sf 与噻虫嗪混合处理组中 GSTs 活性降低了 11.87%，表现为抑制作用；处理 48 和 60 h，Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 GSTs 活性均其他处理组，表现为激活作用。

2.6　芫菁夜蛾斯氏线虫与噻虫嗪混用对韭蛆体内 AChE 活性的影响

芫菁夜蛾斯氏线虫 SF-SN(Sf)与噻虫嗪混用对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫体内 AChE 活性的影响如图 3(D)所示，随着处理时间的延长，幼虫体内 AChE 活性呈现激活-抑制-激活规律。和对照组相比，处理 12 h 时，Sf 处理组、噻虫嗪处理组和 Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 AChE 活性分别提高了 42.05%，19.74% 和 62.56%，且 Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 AChE 活性显著高于其他处理组，表现为更高的激活作用($F = 93.208$, $df = 3$, $P < 0.001$)；处理 24 h，Sf 处理组和噻虫嗪处理组中的 AChE 活性分别提高了 56.56% 和 52.19%，均表现为激活作用，而 Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 AChE 活性降低了 71.04%，表现为更强烈的抑制作用；处理 36 h，Sf 处理组中的 AChE 活性提高了 20.81%，表现为激活作用，而噻虫嗪处理组和 Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 AChE 活性分别降低了 9.81% 和 58.37%，且 Sf 与噻虫嗪混合处理组表现为更强烈的抑制作用；处理 48 和 60 h，Sf 与噻虫嗪混合处理组中的 AChE 活性均表现为激活作用。

3　讨论

昆虫病原线虫与环境友好型化学杀虫剂混用是防治地下害虫的一个有效途径(武海斌等, 2016)，选择对昆虫病原线虫安全的杀虫剂是混用成功的关键(王玉东等, 2012)。前期研究表明，新烟碱类杀虫剂如吡虫啉、噻虫嗪均对昆虫病原线虫的存活没有影响(Yan *et al.*, 2012; 武海斌等, 2014, 2016)，为昆虫病原线虫与新烟碱类杀虫剂混用防治害虫奠定了基础。本研究中，测试了 LC_{50} 的噻虫嗪(15 mg/L)与 LD_{50} 的 *S. feltiae* SF-SN(60 条/幼虫)混用对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫的致死效果，其 LT_{50} 值比两者单用时显著缩短(表 1)，且在处理 72 h 时，其引起的校正死亡率显著高于两者单用(图 1)。这与王果红等(2007)和武海斌等(2015a)分别利用小卷叶蛾斯氏线虫 *S. carpocapsae* All 与吡虫啉混用防治褐纹甘薯象 *Rhabdoscelus lineaticollis* 及小卷蛾斯氏线虫 *S. carpocapsae* NC116 与苦参碱混用防治小地老虎 *Agrotis ypsilon* 的研究结果一致，即两者混用的防治效果均明显优于两者单用。

昆虫血淋巴中的蛋白质有很多种，这些蛋白质不仅与组织形成的物质代谢有关，而且与虫体生长发育的激素调控以及产生抗药性和免疫机制等都有密切的关系(孙昊雨等, 2014)。本研究中分别利用 *S. feltiae* SF-SN 单剂、噻虫嗪单剂以及 *S. feltiae* SF-SN 与噻虫嗪混用对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫进行处

理。结果表明，与对照组相比，随着处理时间延长，*S. feltiae* SF-SN 处理表现为韭蛆体内酶液蛋白含量先升高后降低的趋势，这与任晓亚（2014）测定斯氏线虫 *S. feltiae* 90 感染桃小食心虫对桃小食心虫蛋白含量的变化趋势一致；而 *S. feltiae* SF-SN 与噻虫嗪混合处理同样表现为先升高后降低的趋势，且在 24 h（$P<0.001$）和 36 h（$P<0.001$）时均显著高于对照组、*S. feltiae* SF-SN 处理组、噻虫嗪处理组（图 3）。其原因可能是两者混用后比两者单用更有利于韭蛆组织蛋白的大量合成或解离，从而产生多种防御反应，而造成影响合成或解离相关的蛋白及其基因还应做进一步的研究。

昆虫体内的保护酶相互协调作用，清除昆虫体内的活性氧或过氧化物自由基，防御其对生物体的毒害。寄主保护酶活性变化可作为测定外界刺激物的强弱和昆虫耐药及抗逆能力的重要指标（任晓燕，2014）。而解毒酶可代谢内源或外源有毒物质（如杀虫剂、病原物和植物次生物质等），其活性增强是昆虫对有毒物质产生抗药性的机制之一，但也有杀虫剂通过抑制其活性从而达到杀虫效果（贾变桃等，2016）。本研究中，利用 *S. feltiae* SF-SN 侵染韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫后，其体内 SOD，CAT，GSTs 和 AChE 酶活性总体呈现激活-抑制的趋势，这与任晓亚等（2013）、阎爱华等（2012）分别关于光肩星天牛感染昆虫病原线虫后，其保护酶 SOD 与 CAT 酶及解毒酶 GSTs 与 AChE 酶的活性变化趋势相同。本研究利用 LC_{50} 浓度的噻虫嗪处理韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫后，其体内 SOD，CAT 和 AChE 酶活性总体呈现激活-抑制的趋势，而对 GSTs 酶活性则总体呈现抑制作用，说明在韭蛆尚未对噻虫嗪产生抗性时，GSTs 对噻虫嗪的解毒代谢还未发挥作用，这与任学祥等（2011）利用噻虫胺对桃蚜 *Myzus persicae* 的 GSTs 酶活性变化趋势相同。*S. feltiae* SF-SN 与噻虫嗪混合处理韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫后，其体内 SOD，CAT 和 AChE 酶活性表现出相似的变化趋势，呈先激活升高、后被抑制降低，最后再激活升高，且处理 24 h 和 36 h 时，均显著低于对照组、*S. feltiae* SF-SN 处理组和噻虫嗪处理组（$P<0.001$），表现出比单剂更强的抑制作用；而体内 GSTs 酶活性在处理 12，24 和 36 h 时，均显著低于对照组、*S. feltiae* SF-SN 处理组和噻虫嗪处理组（$P<0.001$），具有比单剂更强的抑制作用。其原因可能由于 *S. feltiae* SF-SN 与噻虫嗪混用比单独应用 *S. feltiae* SF-SN 和噻虫嗪具有更强杀虫能力，从而加快扰乱韭蛆的防御能力，提高了两者混用后的杀虫效果，达到了有效控制韭蛆的目的。本研究中，*S. feltiae* SF-SN 与噻虫嗪混合处理对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫的 LT_{50} 值仅为 41.05 h（表 1），且在处理 24 h 后其致死效果均显著高于两者单用（$P<0.001$）（图 1），这一研究结果也验证了此推论。

本研究基于昆虫病原线虫与环境友好型药剂混用的增效机理推测（Fallon *et al*., 2004），明确了两者混用后对韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫体内酶液蛋白质含量、2 种保护酶和 2 种解毒酶活性的变化，但其两者共同作用下的增效作用机理还需进一步的研究。

参考文献（References）

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of mocrogram quantities of protein utilization the principles of protein-dye binding. *Anal. Bichem*., 72: 248–254.

Cao X, Zhu CY, Zhang MX, Ling B, 2015. Bioactivity of momordicin I against *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and its effects on the metabolizing enzyme activities in larval bodies of the moth. *Acta Entomol. Sin*., 58(6): 625–633. ［曹溪，朱春亚，张茂新，凌冰，2015. 苦瓜素 I 对亚洲玉米螟的生物活性及对其幼虫体内代谢酶活性的影响. 昆虫学报，58(6): 625–633］

Cloyd RA, Dickinson A, 2006. Effect of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and neonicotinoid insecticides on the fungus gnat *Bradysia* sp nr. *coprophila* (Lintner) (Diptera: Sciaridae). *Pest Manag. Sci*., 62: 171–177.

Fallon DJ, Solter LF, Keena M, Manus MM, Cate JR, Hanks LM, 2004. Susceptibility of Asian long horned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) (Coleoptera: Cerambycidae) to entomopathogenic nematodes. *Biol. Control*, 30(2): 430–438.

Gao HH, Zhai YF, Xu N, Qin DY, Ge WB, Yu Y, 2016. Defensive responses of *Bradysia odoriphaga* to inoculation of five species of bacteria. *J. Environ. Entomol*., 38(3): 582–588. ［高欢欢，翟一凡，徐楠，覃冬云，葛温伯，于毅，2016. 五种细菌侵染后韭菜迟眼蕈蚊体内防御反应的研究. 环境昆虫学报，38(3): 582–588］

Georgis R, Gaugler R, 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *J. Econ. Entomol*., 84(3): 713–720.

Jia BT, Hong SS, Zhang YC, Cao YW, 2016. Effect of sublethal concentrations of abamectin on protective and detoxifying enzymes in *Diagegma semclausum*. *J. Environ. Entomol*., 38(5): 990–995. ［贾变桃，洪珊珊，张雨超，曹永伟，2016. 阿维菌素对半闭弯尾姬蜂保护酶系和解毒酶系的影响. 环境昆虫学报，38(5): 990–995］

Koppenhöfer AM, Brown IM, Gaugler R, Grewal PS, Kaya HK, Klein MG, 2000. Synergism of entomopathogenic nematodes and imidacloprid against white grubs: greenhouse and field evaluation. *Biol. Control*, 19(3): 245–251.

Li WX, Yang YT, Xie W, Wu QJ, Xu BY, Wang SL, Zhu X, Wang SJ, Zhang YJ, 2015. Effects of temperature on the age-stage, two-sex life table of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae). *J.*

Econ. Entomol., 108(1): 126 – 134.

Ma J, Chen SL, Moens M, Han R, De Clercq P, 2013. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) against the chive gnat, *Bradysia odoriphaga*. *J. Pest Sci.*, 86(3): 551 – 561.

Ren XX, Wang G, Zuo YM, Wang KY, Wang J, 2011. The toxicity and effects of sublethal doses on detoxifying enzymes of clothianidin to *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Acta Entomol. Sin.*, 54(3): 209 – 305. [任学祥，王刚，左一鸣，王开运，王杰，2011. 噻虫胺对桃蚜的毒力及其亚致死剂量对桃蚜解毒酶系活力的影响. 昆虫学报，54(3): 209 – 305]

Ren XY, 2014. Screening of Entomopathogenetic Nematodes and Their Virulence to *Carposina sasakii* Matsumura. MSc Thesis, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei. [任晓亚，2014. 桃小食心虫高致病性昆虫病原线虫的分离及其致病机理研究. 河北保定：河北农业大学硕士学位论文]

Ren XY, Li N, Wang ZG, Yan AH, 2013. Changes of the activities of protective enzymes in *Anoplophora glabripenni* infected by entomopathogenic nematodes. *J. Hebei Agric. Univ.*, 36(4): 97 – 100. [任晓亚，李宁，王志刚，阎爱华，2013. 昆虫病原线虫对光肩星天牛保护酶活性的影响. 河北农业大学学报，36(4): 97 – 100]

Shapiro DI, McCoy WW, 2000. Virulence of entomopathogenic nematodes to *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. *J. Econ. Entomol.*, 93(4): 1090 – 1095.

Sun HY, Liu SS, Xi JH, Tian LL, Liu CQ, Yin J, Cao YZ, Li KB, 2014. Effects of *Heterorhabditis bacteriophora* infection on enzymes activities and energy substances content in white grubs. *Chin. J. Biol. Control*, 30(1): 65 – 72. [孙昊雨，刘树森，席景会，田雷雷，刘春琴，尹姣，曹雅忠，李克斌，2014. 蛴螬感染嗜菌异小杆线虫后酶活性和能源物质含量变化. 中国生物防治学报，30(1): 65 – 72]

Wang GH, Han RC, Chen JH, Cao L, 2007. Combined efficacy of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* All and pesticide against *Rhabdoscelus lineaticollis* (Heller). *Chin. J. Biol. Control*, 23(3): 218 – 222. [王果红，韩日畴，陈静华，曹莉，2007. 利用昆虫病原线虫与化学农药混用防治褐纹甘薯象. 中国生物防治，23(3): 218 – 222]

Wang YD, Xiao C, Yin J, Cao YZ, Li KB, 2012. Evaluation of the impacts on infection ability of entomopathogens nematodes to grub, *Holotrichia parallela* for three chemical pesticides. *Chin. J. Biol. Control*, 28(1): 67 – 73. [王玉东，肖春，尹姣，曹雅忠，李克斌，2012. 三种化学杀虫剂对病原线虫侵染暗黑鳃金龟能力的影响. 中国生物防治学报，28(1): 67 – 73]

Wu HB, Fan K, Xin L, Cao GP, Sun RH, 2015a. Virulence and control effect of entomopathogenic nematodes against *Agrotis ypsilon* (Rottemberg). *Acta Phytoph. Sin.*, 42(2): 244 – 250. [武海斌，范昆，辛力，曹广平，孙瑞红，2015a. 昆虫病原线虫对小地老虎的致病力测定及防治效果. 植物保护学报，42(2): 244 – 250]

Wu HB, Gong QT, Fan K, Sun RH, Xu YY, Zhang KP, 2017. Synergistic effect of entomopathogenic nematodes and thiamethoxam in controlling *Bradysia odoriphaga* Yang and Zhang (Diptera: Sciaridae). *Biol. Control*, 111: 53 – 60.

Wu HB, Gong QT, Zhang KP, Zhang XP, Sun RH, 2015b. The efficacy of synergism of entomopathogenic nematodes and sticky cards with black color to *Bradysia odoriphaga*. *Acta Phytophyl. Sin.*, 42(4): 632 – 638. [武海斌，宫庆涛，张坤鹏，张学萍，孙瑞红，2015b. 昆虫病原线虫与黑色粘板配合使用对韭菜迟眼蕈蚊的防治. 植物保护学报，42(4): 632 – 638]

Wu HB, Ling F, Gong QT, Fu L, Xu YY, Sun RH, 2016. Evaluation of the effects of infection by different entomopathogenic nematodes and thiamethoxam on *Bradysia odoriphaga*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 53(6): 1233 – 1241. [武海斌，凌飞，宫庆涛，付丽，许永玉，孙瑞红，2016. 噻虫嗪对昆虫病原线虫侵染韭菜迟眼蕈蚊能力的影响. 应用昆虫学报，53(6): 1233 – 1241]

Wu HB, Xin L, Gong QT, Zhang KP, Cao GP, Sun RH, 2014. Evaluation of the effects of infection by different entomopathogenic nematodes and chemical pesticides on *Bradysia odoriphaga*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 51(4): 1060 – 1068. [武海斌，辛力，宫庆涛，张坤鹏，曹广平，孙瑞红，2014. 化学杀虫剂对昆虫病原线虫侵染韭菜迟眼蕈蚊能力的影响. 应用昆虫学报，51(4): 1060 – 1068]

Yan AH, Ren XY, Li N, Wang ZG, 2012. Changes of three kinds of detoxification enzymes activities in *Anoplophora glabripennis* infected by entomopathogenetic nematodes. *J. Hebei Agric. Sci.*, 16(10): 76 – 80. [阎爱华，任晓亚，李宁，王志刚，2012. 昆虫病原线虫侵染对光肩星天牛 3 种解毒酶活性的影响. 河北农业科学，16(10): 76 – 80]

Yan X, Moens M, Han R, Chen S, De Clercq P, 2012. Effects of selected insecticides on osmotically treated entomopathogenic nematodes. *J. Plant Dis. Prot.*, 119: 152 – 158.

Yang JK, Zhang XM, 1985. Notes on the fragrant onion gnats with descriptions of two new species of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae). *Acta Agric. Univ. Pekinen.*, 10(2): 153 – 158. [杨集昆，张学敏，1985. 韭菜蛆的鉴定迟眼蕈蚊属二新种(双翅目：眼蕈蚊科). 中国农业大学学报，10(2): 153 – 158]

Yu HL, Xiang X, Yuan GX, Chen YQ, Wang XG, 2015. Effects of sublethal doses of cyantraniliprole on the growth and development and the activities of detoxifying enzymes in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(6): 634 – 641. [余慧灵，向兴，袁贵鑫，陈羿渠，王学贵，2015. 溴氰虫酰胺亚致死剂量对甜菜夜蛾生长发育及体内解毒酶活性的影响. 昆虫学报，58(6): 634 – 641]

Zhang P, Chen CY, Li H, Liu F, Mu W, 2014. Selective toxicity of seven neonicotinoid insecticides to *Bradysia odoriphaga* and *Eisenia foetida*. *Acta Phytophyl. Sin.*, 41(1): 79 – 86. [张鹏，陈澄宇，李慧，刘峰，慕卫，2014. 七种新烟碱类杀虫剂对韭菜迟眼蕈蚊幼虫及蚯蚓的选择毒力. 植物保护学报，41(1): 79 – 86]

Zhang P, He M, Wei Y, Zhao YH, Ren YP, Mu W, Liu F, 2016. Comparative soil distribution and dissipation of phoxim and thiamethoxam and their efficacy in controlling *Bradysia odoriphaga* Yang and Zhang in Chinese chive ecosystems. *Crop Prot.*, 9: 1 – 8.

Zhao YH, Xu CM, Wang QH, Wei Y, Liu F, Xu SY, Zhang ZQ, Mu W, 2016. Effects of the microbial secondary metabolite benzothiazole on the nutritional physiology and enzyme activities of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 129: 49 – 55.

Zhu-Salzman K, Zeng RS, 2015. Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annu. Rev. Entomol.*, 60(1): 233 – 252.

（责任编辑：赵利辉）